

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 661640	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/41.6)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/06473	国際出願日 (日.月.年) 19.11.99	優先日 (日.月.年) 20.11.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>1</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53		
出願人 (氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.06.00	国際予備審査報告を作成した日 20.02.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤浩 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9050



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |                |                       |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの        |
|                                     |                |                       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの        |
|                                     |                |                       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの        |
|                                     |                |                       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 出願時に提出されたもの           |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの        |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	27-34	有
	請求の範囲	1-26	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-34	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-34	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-26

文献1: Human Molecular Genetics, Vol.2 No.10 (1993) p.1589-1595  
 文献2: Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.239 (1997)  
 p.386-391

文献1、文献2には、セリンプロテアーゼ及びこれをコードするDNAが記載されている。

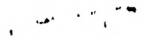
DNAをベクターに組み込んで宿主細胞に導入することは当業者が適宜なし得る程度のことであり、上記DNAをベクターに組み込んで宿主細胞に導入することには、格別の困難性は認められない。

また、タンパク質に対する抗体を得ることは、当業者が適宜なし得る程度のことであり、上記セリンプロテアーゼから、これに対する抗体を得ることには、格別の困難性は認められない。

請求の範囲 27-34

文献3: WO, 97/24135, A1 (LU Tianbao et al.) 10.7月.97(10.78.97)  
 文献4: US, 5731439, A (The DuPont Merck Pharmaceutical Company) 24.3月.98  
 (24.03.98)

文献3、文献4には、セリンプロテアーゼが様々な疾患に関連していることが記載されているので、これをそのような疾患の指標とすることは、当業者が容易になし得ることと認められる。



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06473

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08,  
G01N33/53 // (C12N9/50, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08,  
G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Human Molecular Genetics Vol.2 No.10 (1993) Larsen F., et al., "A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1"p.1589-1595, especially p.1590, right column to p.1591, left column; Fig. 5	1-26 27-34
X Y	Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.239 (1997) Yamamura Y., et al., "Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs"p.386-392, especially, p.387, left column	1-26 27-34
A Y	WO, 97/24135, A1 (LU Tianbao et al.), 10 July, 1997 (10.07.97), especially, p.1-2 & AU, 9714323, A & NO, 9802987, A & CZ, 9802066, A3 & EP, 883405, A1 & NZ, 326076, A & AU, 706145, B & BR, 9612360, A & HU, 9902256, A2	1-26 27-34
A Y	US, 5731439, A (The DuPont Merck Pharmaceutical Company), 24 March, 1998 (24.03.98),	1-26 27-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 February, 2000 (10.02.00)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



EP



P

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)  
[PCT 18 条、PCT 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 6 6 1 6 4 0	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記 5 を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/06473	国際出願日 (日.月.年) 19. 11. 99	優先日 (日.月.年) 20. 11. 98	
出願人 (氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (PCT 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53  
 //(C12N9/50, C12R1:19)(C12N1/21, C12R1:19)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Human Molecular Genetics Vol.2 No.10 (1993) Larsen F. et al. "A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1" p.1589-1595 特にp.1590右欄～ p.1591左欄、図5	1-26 27-34
X Y	Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.239 (1997) Yamamura Y. et al. "Molecular cloning of a novel brain -specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs" p.386-392 特に p.387左欄	1-26 27-34

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.02.00

国際調査報告の発送日

22.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{A}{Y}$	WO, 97/24135, A1 (LU Tianbao et al.) 10.7月.97 (10.07.97) 特に p.1-2 & AU, 9714323, A & NO, 9802987, A & CZ, 9802066, A3 & EP, 883405, A1 & NZ, 326076, A & AU, 706145, B & BR, 9612360, A & HU, 9902256, A2	$\frac{1-26}{27-34}$
$\frac{A}{Y}$	US, 5731439, A (The DuPont Merck Pharmaceutical Company) 24.3月.98 (24.03.98) 特に 第17欄 (ファミリーなし)	$\frac{1-26}{27-34}$



12  
Translation

09/856319

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

1632

1600

Applicant's or agent's file reference 661640	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06473	International filing date (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)	Priority date (day/month/year) 20 November 1998 (20.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/50, 15/57, 1/21, A01K 67/027, C07K 16/40, C12P 21/08, G01N 33/53		
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

RECEIVED  
MAR 12 2002  
TECH CENTER 1600/2900

Date of submission of the demand 07 June 2000 (07.06.00)	Date of completion of this report 20 February 2001 (20.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06473

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06473

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	27-34	YES
	Claims	1-26	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-34	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-34	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

#### Claims 1-26

Document 1: Human Molecular Genetics, Vol. 2, No. 10 (1993), pages 1589-1595

Document 2: Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 239 (1997), pages 386-391

Documents 1 and 2 describe serine protease and a DNA encoding it.

To integrate a DNA in a vector and transfect it into a host cell is considered to be within the ordinary ability expected of a person skilled in the art, and it is not considered to be particularly difficult to integrate the above DNA in a vector and transfect into a host cell.

Furthermore, it is considered to be within the ordinary ability expected of a person skilled in the art to obtain an antibody against a protein and it is not considered to be particularly difficult to obtain an antibody against it from the above-stated serine protease.

#### Claims 27-34

Document 3: WO, 97-24135, A1 (LU Tianbao et al.), 10 July, 1997 (10.07.97)

Document 4: US, 5731439, A (The DuPont Merck Pharmaceutical Company), 24 March, 1998 (24.03.98)

Documents 3 and 4 describe that serine protease relates to various diseases, and it is considered that a person skilled in the art could have easily conceived of using it as an indication of such diseases.



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

27-34

有

請求の範囲

1-26

無

進歩性(I S)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-34

無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲

1-34

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-26

文献1: Human Molecular Genetics, Vol. 2 No. 10 (1993) p. 1589-1595

文献2: Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 239 (1997)  
p. 386-391

文献1、文献2には、セリンプロテアーゼ及びこれをコードするDNAが記載されている。

DNAをベクターに組み込んで宿主細胞に導入することは当業者が適宜なし得る程度のものであり、上記DNAをベクターに組み込んで宿主細胞に導入することには、格別の困難性は認められない。

また、タンパク質に対する抗体を得ることは、当業者が適宜なし得る程度のものであり、上記セリンプロテアーゼから、これに対する抗体を得ることには、格別の困難性は認められない。

請求の範囲27-34

文献3: WO, 97/24135, A1 (LU Tianbao et al.) 10.7月.97(10.78.97)

文献4: US, 5731439, A (The DuPont Merck Pharmaceutical Company) 24.3月.98  
(24.03.98)

文献3、文献4には、セリンプロテアーゼが様々な疾患に関連していることが記載されているので、これをそのような疾患の指標とすることは、当業者が容易になし得ることと認められる。



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 29 June 2000 (29.06.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/06473	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 661640
<b>International filing date (day/month/year)</b> 19 November 1999 (19.11.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 20 November 1998 (20.11.98)
<b>Applicant</b> UEMURA, Hidetoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 June 2000 (07.06.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Antonia Muller</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	---



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 9/50, 15/57, 1/21, A01K 67/027, C07K 16/40, C12P 21/08, G01N 33/53 // (C12N 9/50, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 <b>WO00/31243</b></p> <p>(43) 国際公開日 2000年6月2日(02.06.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06473</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月19日(19.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/347806 1998年11月20日(20.11.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 植村英俊(UEMURA, Hidetoshi)[JP/JP] 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文(OKUI, Akira)[JP/JP] 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ陸603号 Nara, (JP) 小南勝也(KOMINAMI, Katsuya)[JP/JP] 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)[JP/JP] 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御盤口町285-79 Kyoto, (JP)</p>	<p>三井真一(MITSUI, Shinichi)[JP/JP] 〒606-8267 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: <b>NOVEL SERINE PROTEASE BSSP5</b></p> <p>(54)発明の名称 <b>新規セリンプロテアーゼBSSP5</b></p> <p>(57) Abstract Proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2 and 4; proteins having amino acid sequences derived from these amino acid sequences by deletion, substitution or addition of one to several amino acids; and base sequences encoding the same. Transgenic non-human animals with altered expression level of a serine protease BSSP5; an antibody against BSSP5; and a method for detecting BSSP5 in a specimen by using the antibody. The BSSP5 thus provided is useable in treating and diagnosing various diseases such as Alzheimer's disease (AD), epilepsy, cancer, inflammation, sterility and prostatic hypertrophy and detecting pancreatitis in various tissues including brain, prostate gland, placenta, testis, pancreas and spleen.</p>		

本発明は、配列番号2および4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、セリンプロテアーゼであるBSSP5の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP5に対する抗体、該抗体を用いる検体中のBSSP5の検出方法を提供する。本発明により提供されるBSSP5は、脳、前立腺、胎盤、精巣、膵臓および脾臓等の各種組織において、アルツハイマー病(AD)、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断、および膵炎の検出に利用できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BY ベラルーシ  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CR コスタ・リカ  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェッコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク

DM ドミニカ  
EE エストニア  
ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE グルジア  
GH ガーナ  
GM ガンビア  
GN ギニア  
GW ギニア・ビサウ  
HR キリシャ  
HU クロアチア  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国

KZ カザフスタン  
LC セントルシア  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリ・ランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LU ルクセンブルグ  
LV ラトヴィア  
MA モロッコ  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア  
共和国  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノールウェー  
NZ ニュージーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア

RU ロシア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SG シンガポール  
SI スロヴェニア  
SK スロヴァキア  
SL シエラ・レオネ  
SN セネガル  
SZ スワジランド  
TD チャード  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TZ タンザニア  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ヴィエトナム  
YU ユーゴスラビア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ

## 明 細 書

## 新規セリンプロテアーゼ B S S P 5

## 5 発明の分野

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「h B S S P 5」および「m B S S P 5」と称し、両者を区別しない場合は単に「B S S P 5」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種ならびにそれらの検出方法に関する。さらには、h B S  
10 S P 5 および m B S S P 5 タンパク質ならびに h B S S P 5 および m B S S P 5  
ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含む組成物、それらの製造方法および使用に関する。

## 発明の背景

15 プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステイン  
20 プロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパクは、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に  
25 ナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を

持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、このようなタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

- 5       例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

10       セリンプロテアーゼの至適pHは、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に30,000以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

15       最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより多くの新規プロテアーゼのcDNAおよびアミノ酸配列が決定されている。この方法により、Yamamuraら（Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997）、Gschwendら（Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997）、Chenら（Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995）およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

20       特開平9-149790号の配列番号3には新規セリンプロテアーゼニューロシン（Neurosin）が開示されており、またニューロシンは Biochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いてニューロシンを大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

25       ニューロシンのように脳・神経系で発現されるセリンプロテアーゼは脳・神経系において種々の役割を果たしていると考えられる。従って、脳・神経系において発現されている新規プロテアーゼをコードする遺伝子の単離およびこの遺伝子を使用したタンパク質の生産は、脳・神経系に関連する各種疾患の診断および治

療に有用である可能性がある。

ADの臨床診断は今日、DSM-III-RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準 (McKhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994) または、DSM-IVの診断基準 (American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994) に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。

また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MR S検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確的な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可

能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、A $\beta$ およびその前駆体タンパク質である $\beta$ APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、ApoEおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-P A) がある。U-P Aはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素およびコラゲナーゼ等が知られている。

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。

ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等に利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク（AFP）（Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988）および癌胎児性タンパク抗原（CEA）は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン（hK2）は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2は前立腺特異的抗原（PSA）の配列と78%の相同性を有しており、PSAも前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている（Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998、Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997、Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997、Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997）。

#### 発明の目的

ゆえに、本発明の主な目的は、脳、前立腺、胎盤、精巣、膵臓および脾臓等の各種組織において、アルツハイマー病（AD）、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得え、さらに、膵炎の検出にも使用することのできる新規セリンプロテアーゼを提供することである。

#### 発明の概要

この様な状況の下、我々はマウスおよびヒトの新規セリンプロテアーゼをコードするcDNAのクローニングに成功した。

本発明を概説すれば、本発明の第1の態様は、生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼhBSSP5およびmBSSP5アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

すなわち、配列番号2に示すアミノ酸231個から成るアミノ酸配列（成熟型hBSSP5（配列番号2、アミノ酸番号1～231））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号110～802）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（例えばカルシウム付加体）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。

さらに、配列番号4に示すアミノ酸231個から成るアミノ酸配列（成熟型mBSSP5（配列番号4、アミノ酸番号1～231））および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号132～824）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第2の態様は、配列番号4のアミノ酸番号－33～－1に示すアミノ酸33個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号3、33～131）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の第3の態様は、成熟体mBSSP5アミノ酸配列（配列番号4）のN末端側に、配列番号4に示す－33～－1までの33個のアミノ酸が付加された、アミノ酸264個から成るアミノ酸配列（前駆体型mBSSP5（配列番号4、アミノ酸番号－33～231））および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列

番号3、塩基番号33～824)である。また、実質的に配列番号4に示すアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

5       また、本発明は、配列番号1および3に示す塩基配列、ならびにこれらに類似する塩基配列にも関する。

      本発明の第4の態様は、第1～第3の態様の塩基配列を含むベクター、これにより形質転換された形質転換細胞である。

10       本発明の第5の態様は、第4の態様の形質転換細胞からBSSP5タンパク質を製造する方法である。

      本発明の第6の態様は、BSSP5遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物である。

      本発明の第7の態様は、BSSP5タンパク質またはその断片に対する抗体およびその製造方法である。

15       本発明の第8の態様は、第7の態様の抗体を用いる検体中のBSSP5タンパク質またはその断片を測定する方法である。

      本発明の第9の態様は、BSSP5タンパク質を含む疾患の診断マーカーである。

20       本発明の第10の態様は、BSSP5タンパク質濃度を測定することによる肺炎の検出方法、BSSP5タンパク質またはその断片に対する抗体を含む肺炎の検出剤、さらに肺炎の検出用の抗体の製造におけるBSSP5タンパク質の使用である。

25       以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、BSSP5、hBSSP5、mBSSP5には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

### 図面の簡単な説明

図1は、human multiple tissue blot膜を用いたノザンブロットの結果を示す図である。

5 図2は、マウスの各種臓器からのmRNAを用いたノザンブロットの結果を示す図である。

図3は、実施例4の方法により構築したプラスミドを示す図である。

図4は、実施例4の方法によるプラスミドの構築図を示す図である。

図5は、尿中におけるBSSP5の存在を示す図である。

図6は、ラット膀胱炎モデルにおける血中BSSP5濃度の変動を示す図である。

10

### 発明の詳細な説明

本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法 (Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979) 等を用いることができる。全RNAからのポリ(A)+RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフィニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいはhBSSP5もしくはmBSSP5のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして得られたmRNAに相補的なDNAもしくはcDNAから成るハイブリッドのmRNA鎖を、例えばイー・コリ(E. coli) RNase H、イー・コリ DNAポリメラーゼ1、イー・コリ DNAリガーゼで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hBSSP5もしくはmBSSP5発現細胞ポリ(A)+RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、P

CRによらず、hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法 (Mattencci, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981) 等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

上記のようにして得られたhBSSP5またはmBSSP5遺伝子を用いて、各種組織におけるこれらの発現を調べることができる。

10      ノザン・プロット解析の場合、hBSSP5は膵臓で発現を示し、mBSSP5は脾臓で発現が認められた。RT-PCR解析の場合においては、hBSSP5は胎児の脳、および成人の胎盤で発現が認められ、mBSSP5は新生児から成体マウスの脳、および成体マウスの精巣で発現が認められた。ゆえに、脳、胎盤、精巣、膵臓および脾臓において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病 (A  
15      D)、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。また、本発明のBSSP5およびそれをコードする遺伝子は、その他の組織においては癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの  
20      影響を及ぼしていると予想できる。さらに、本発明の新規セリンプロテアーゼの阻害剤は、アルツハイマー病、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および予防に用いることができる。また、本発明のBSSP5は、ラット膵炎モデルにおいて血中濃度の上昇が認められ、膵炎の検出にも用いることができる。

25      ヒト新規セリンプロテアーゼ (hBSSP5) の成熟型はアミノ酸231個から成り、マウス新規セリンプロテアーゼ (mBSSP5) の成熟型はアミノ酸231個から成り、該前駆体型はアミノ酸264個から成ることを証明した。また、成熟型のセリンプロテアーゼのアミノ酸配列中には、セリンプロテアーゼの活性を有するコンセンサス配列が含有されている。

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分と言い、プレプロ部分とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言う。

5 配列番号2のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸配列はアミノ酸231個から成るhBSSP5成熟型あるいは活性型タンパク質であり、これをコードする配列番号1の塩基番号110～802に示す塩基配列は塩基数693個から成る。本発明者らはhBSSP5の成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、配列番号2のアミノ酸番号1～231に示すものが好ましい。

10 配列番号4に示すアミノ酸配列はアミノ酸264個から成るmBSSP5タンパク質であり、それをコードする配列番号3に示す塩基配列は塩基数792個から成る。本発明者らはmBSSP5の成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、配列番号4に示すものが好ましい。配列番号4のアミノ酸番号-33～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、アミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列は、mBSSP5タンパク質の前駆体型と考えられる。

20 なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2もしくは4のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2もしくは4のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および/または挿入を含むと解する。特に、配列番号2もしくは4に示すhBSSP5もしくはmBSSP5成熟型タンパク質のN末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせても、活性が保持される

ことを本発明者らは証明している。

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号2もしくは4のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはこれらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43, 1981)。従って、コドンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含まれる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662, 1984) 等に従って行うことができる。

さらに、配列番号1もしくは3のいずれかに記載の塩基配列またはこれらに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質が本発明によるhBSSP5もしくはmBSSP5と同等の性質を有する限り、そのDNAは本発明によるDNAに含有される。ストリンジントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジントな条件とは、例えば、5×SSC、5%デンハート溶液 (0.1% BSA、0.1% Ficoll 400、0.1% PVP)、0.5% SDSおよび20 μg/ml 変性サケ精子DNAを含有する溶液中で、37℃にて一夜インキュベートし、ついで室温にて0.1% SDS含有2×SSCで洗浄する条件である。SSCの代わりに適宜SSPEを使用してもよい。

配列番号1もしくは3のいずれかに記載の塩基配列に基づいて、hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子を検出するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌ

クレオチドを化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいはPCRの様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。

さらに、本発明が提供するhBSSP5もしくはmBSSP5のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するhBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl. Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5'非翻訳領域、または3'非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

本発明はまた、配列番号1に示す塩基配列もしくは配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列、配列番号3に示す塩基配列もしくは配列番号4のアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいは、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列またはそれに相補的なとハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac4.5、pcDNA3.1、pSecTag2、Novagen社製のpET、pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBluescriptIIもしくはFarmacia社製のpGEX、pUC18/19、pFastBAC1 (GIBCO社製) 等、本発明のタンパク質を発現し得るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のPCR.I

I-TOP0ベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えば p S e c T a g 2 Aベクター、p S e c T a g 2 Bベクター (I n v i t r o g e n 社) を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル核酸配列と、その3' 下流側に、T a g 核酸配列、切断可能核酸配列および本発明の成熟体または活性型タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター (本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付け特許出願明細書) を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグナル、T a g 塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列である、アミノ酸配列 A s p - A s p - A s p - A s p - L y s をコードする塩基配列 (当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される。) を用いることが好ましい。

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞外に分泌することが可能な全ての細胞 (微生物を含む) が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、CHO細胞、COS細胞、BHK細胞、V e r o細胞、ミエローマ細胞、HEK 293細胞、He L a細胞、J u r k a t細胞、マウスL細胞、マウスC 1 2 7細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S 2、S f 9、S f 2 1、H i g h F i v e <sup>TM</sup> (登録商標)細胞等がある。本明細書における微生物とは、大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または/およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本

明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

- 5       上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

- 10       本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP5またはmBSSP5を採取する、hBSSP5またはmBSSP5の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

- 15       本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

- 20       本発明は、hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSP5もしくはmBSSP5遺伝子とは、hBSSP5もしくはmBSSP5をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSP5もしくはmBSSP5の機能あるいは発現調節の研究、hBSSP5もしくはmBSSP5が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

- 25       本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得るこ

とができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、hBSSP5もしくはmBSSP5の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のFLPリコンビナーゼ系等によるin vivoにおける部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変わることが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約10～15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質またはその断片に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

本発明のノックアウトマウスは、mBSSP5 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キ

メラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう)と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

- 5 相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。
- 10

- 本発明はまた、hBSSP5もしくはmBSSP5を認識する抗体を提供する。
- 15 本発明の抗体には例えば、配列番号2もしくは4のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。
- 20

- 本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回
- 25 づつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSP5またはmBSSP5と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495, 1975) やその変法 (J. Immunol. Method, 39, 285, 1980, Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981, Nature, 285, 446, 1980) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗hBSSP5もしくはmBSSP5抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、hBSSP5もしくはmBSSP5抗原を直接または担体と共に吸着させた固相 (例えば、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSP5もしくはmBSSP5抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したhBSSP5もしくはmBSSP5を加え、固相に結合した抗hBSSP5もしくはmBSSP5モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

抗hBSSP5もしくはmBSSP5モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。

ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗hBSSP5もしくはmBSSP5抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ（RIA）法、酵素免疫測定法（ELISA）法、FIA（蛍光イムノアッセイ）法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

#### ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法として

は、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する(J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。

10 フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のFCSを含む細胞培養用培地(IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等)を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP5もしくはmBSSP5に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2および4のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるhBSSP5もしくはmBSSP5特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2および4に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP5ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択す

ることができる。

抗h B S S P 5またはm B S S P 5モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばD E A E）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 $\alpha$ -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。1 g M抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 $\beta$ -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位

にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

hBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、hBSSP5もしくはmBSSP5を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片との免疫学的な結合に基づき、hBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化hBSSP5もしくはmBSSP5と検体中のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を測定する競合法を利用して検体中のhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を測定する方法が挙げられる。

サンドイッチ法によるhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体－hBSSP5もしくはmBSSP5標識化抗体を形成させる2ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体およびhBSSP5もしくはmBSSP5またはその断片を同時に混合する1ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノール-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルトフタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、

ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。

- 10 標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として $\text{H}_2\text{O}_2$ を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイノージー ( $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したものも含まれる。

- 25 架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られ

る酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

- 5       測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、h B S S P 5もしくはm B S S P 5またはその断片を含む試料あるいはこれらの前駆体もしくはその断片を含む試料であれば限定されない。

- 10       上記のようにして得られたh B S S P 5もしくはm B S S P 5またはその断片に対する抗体を用いて、ラット肺炎モデルにおけるB S S P 5血中濃度を測定したところ、その血中濃度の上昇が認められた。これにより、抗B S S P 5抗体を用いて肺炎を検出することも可能である。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

- 15       human brain cDNA library (Clontech社) を鋳型にして、プライマー配列1 ; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG (配列番号14)、2 ; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GA (配列番号15) に示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する塩基配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5  $\mu$  l、10 $\times$ ExTaqバッファーを5  $\mu$  l、dNTPを5  $\mu$  l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製) を0.5  $\mu$  l加え滅菌水で全量を50  $\mu$  lとし、94 $^{\circ}$ C、0.5分、55 $^{\circ}$ C、0.5分、72 $^{\circ}$ C、1分のサイクルで35回PCRを行った。このPCR産物をTOPO TAクローニングキット (Invitrogen社) 添付のpCR II-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、
- 25       LB (Amp<sup>+</sup>) プレート (100  $\mu$  g/mlのアンピシリンを含有する) に播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサー (ABI社) を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列をGenBankで相同性を調べ、未知であったクローン、B S S P 5遺伝子について5' RACE、3' RACE法によりcDNA

全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。すなわち、B S S P 5 クロー  
ン特異的プライマー、G S P 1 プライマー（配列番号 1 6 または配列番号 1 8  
の塩基配列を有するプライマー）、および G S P 2 プライマー（配列番号 1 7 ま  
たは配列番号 1 9 の塩基配列を有するプライマー）を作製し、human brain  
5 Marathon-Ready cDNA (Clontech社)を用いてこの試薬に付属する A P 1 プライマ  
ーと上記 G S P 1 プライマーで 9 4 °C、2 分を 1 サイクル、9 4 °C、3 0 秒、6  
0 °C、3 0 秒、7 2 °C、3 0 秒を 3 5 サイクルする P C R を行った。次に、この  
P C R 産物を 1 / 1 0 0 に希釈したものを 5  $\mu$  l、1 0  $\times$  バッファーを 5  $\mu$  l、  
d N T P を 5  $\mu$  l、1 0  $\mu$  M の上記 G S P 2 プライマーを 1 0 p m o l、試薬に  
10 付属する A P 2 プライマーを 1 0 p m o l、E x T a q を 0. 5 ユニット、滅菌  
水で全量を 5 0  $\mu$  l とし、先と同様に P C R を行った。この P C R 産物を上記 T  
O P O T A クローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行い  
前記クローンの上流、下流領域を得た。またこの配列を基にして O R F を増幅で  
きるようなプライマー（hBSSP5F1（配列番号 2 0）、hBSSP5R1/E（配列番号 2  
15 2））を作製し、human brain Marathon-ready cDNA を鋳型として P C R を行い  
同一クローンであることを確認し、これを T O P O T A クローニングキットに  
添付の p C R I I - T O P O ベクターにクローニングし、全長の c D N A クロー  
ンが入ったプラスミド p C R I I / h B S S P 5 を得た。このプラスミド中に含  
まれる D N A の塩基配列を配列番号 1 に、この塩基配列から推定される h B S S  
20 P 5 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

同様の手順により下記のプライマーを使用し、mouse brain Marathon-Ready  
cDNA (Clontech社)を鋳型にして 5' R A C E、3' R A C E 法を行い、クロー  
ニングしてマウスの相同性のある遺伝子を含むプラスミド p C R I I / m B S S  
P 5 を得た。このプラスミド中に含まれる D N A の塩基配列を配列番号 3 に、こ  
25 の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。配列番号 4 に示す  
アミノ酸配列はアミノ酸 2 6 4 個から成る m B S S P 5 タンパク質であり、それ  
をコードする配列番号 3 に示す塩基配列は塩基数 7 9 2 個から成る。配列番号 4  
のアミノ酸番号 - 3 3 ~ - 1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、アミノ酸  
番号 - 3 3 ~ 2 3 1 に示すアミノ酸配列は、m B S S P 5 タンパク質の前駆体型

と考えられる。

	配列番号	プライマー名	向き	配 列	用途
	human BSSP5				
5	1 6		Forward	TGTCAGCCCTGGCCGCCATT	RACE
	1 7		Forward	GCGAGTATGACCGATCATCA	RACE
	1 8		Reverse	CGCCACCTGCACAGATCATG	RACE
	1 9		Reverse	GAATCAGTGCCGGCAGTACT	RACE
	2 0	hBSSP5F1	Forward	TGCCACGATGTTGCTGCTCA	全長用
10	2 1	hBSSP5F2	Forward	ATTGTCAACGGGGAGAATGC	mature
	2 2	hBSSP5R1/E	Reverse	GGAATTCGGGTCTTTAATGGGTTGAGC	全長用
	2 3	hBSSP5R4	Reverse	CCTGGCACGAGGAGGCAC	RT-PCR用
	mouse BSSP5				
	2 4	mBSSP5F1	Forward	ACCATGAACAATGACCTGAC	RACE
15	2 5	mBSSP5F2	Forward	GAATCAGTGTCGGCAGT	RACE
	2 6	mBSSP5F3	Forward	GACCATCTCAACACCATTCC	全長用
	2 7	mBSSP5Fmature	Forward	ATTGTCAACGGGGAGAATGC	mature
	2 8	mBSSP5.1	Reverse	ATGGCATCGGTAATGCGTGC	RACE
	2 9	mBSSP5R2	Reverse	CAGGTGTTCCCTTCTGGCA	RACE
20	3 0	mBSSP5R3/E	Reverse	GGAATTCGGACAGTTTAGTTGTAGGCC	全長用

実施例2 h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 遺伝子のヒトおよびマウス臓器での発現

B a l b / c マウスあるいはその胎児の各種臓器から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit (Amersham-Pharmacia) のプロトコルに従い、mRNA を単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。このフィルターを p C R I I / m B S S P 5 より m B S S P 5 の成熟体をコードする部分 (配列番号 3、塩基番号 1 3 2 ~ 8 2 4) を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T P で標識したプローブを 5 × S S C で希釈したものと、6 5 °C で一昼夜反応さ

せた。同様に、human multiple tissue blot (Clontech社製)膜を p C R I I /  
h B S S P 5 の成熟体をコードする部分 (配列番号 1、塩基番号 110~80  
2) を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T P で標識したプローブを 5×SSC で希  
釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。その後、フィルターを 2×SSC  
5 /0.1% SDS で室温 30 分間、1×SSC /0.1% SDS で室温 30 分  
間、0.1×SSC /0.1% SDS で 65℃ 30 分間で 2 回洗い、FLA  
2000 用イメージングプレート (富士フイルム社) に 1 日露光させ、解析した。  
human multiple tissue blot (Clontech社製)膜を用いた結果 (図 1) および生  
後 3 ヶ月のマウスの各種臓器から調製した mRNA を用いた結果 (図 2) を示す。  
10 また、上記で作製した mRNA を Ready To Go RT-PCR Beads (Amersham-  
Pharmacia) を用いてキット添付のプロトコール通りに h B S S P 5 および m B S  
S P 5 について遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った (配列番  
号 20 および 22 で増幅し、さらに配列番号 21 および 23 で増幅させた)。

図 1 および図 2 から、ノザン・プロット解析の場合、h B S S P 5 は脾臓で発  
15 現を示し、m B S S P 5 は脾臓で発現が認められた。また、RT-PCR 解析の  
場合、h B S S P 5 は胎児の脳、および成体の胎盤で発現が認められ、m B S S  
P 5 は新生児から成体マウスの脳および精巣で発現が認められた。ゆえに、脳、  
胎盤、脾臓、脾臓および精巣において、本新規セリンプロテアーゼが様々な役割  
を担っていると予想される。

20 実施例 3 h B S S P 5 もしくは m B S S P 5 遺伝子がコードする新規セリン  
プロテアーゼ成熟タンパク質の酵素活性の測定

#### (1) 発現プラスミドの構築

プラスミド p C R I I / h B S S P 5 または p C R I I / m B S S P 5 をテン  
プレートに、h B S S P 5 タンパク質または m B S S P 5 タンパク質の成熟体タ  
25 ンパク質をコードする領域を含む c D N A 断片を PCR 反応にて増幅した (使用  
したプライマーは、ヒトについては配列番号 21 および 22 の配列を有するプライ  
マーであり、マウスについては配列番号 27 および 30 の配列を有するプライ  
マーであった。)。この PCR 産物をそれぞれ p T r c - H i s B (Invitrogen)  
を B a m H I で消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常

法通りにライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換させ、生じたコロニーを PCR 法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミド pTrcHis/hBSSP5 および pTrcHis/mBSSP5 を含む大腸菌を得た。

得られた大腸菌は、それぞれ E. coli pTrcHis/hBSSP5 および E. coli pTrcHis/mBSSP5 と命名し、1998 年 10 月 29 日より、受託番号 FERM P-17038 および FERM P-17035 の下、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1-3 通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に寄託してある。

#### (2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを 10 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、一晚 37℃ で培養した。これを 250 ml の LB (Amp+) 培地に接種し、37℃ で培養した。600 nm の吸光度が 0.5 になった時、250  $\mu$ l の 0.1 M IPTG (イソプロピルー  $\beta$ -D (-) チオガラクトピラノシド) を加え、更に 5 時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー (10 mM リン酸バッファー pH 7.5、1 mM EDTA) で懸濁し、氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000 rpm、4℃ で 20 分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を 0.5% Triton X-100 を含む菌体破壊バッファーで 2 度洗浄し、Triton X-100 を取り除くために水洗した後に 8 M の尿素を含む変性バッファー (8 M Urea、50 mM Tris pH 8.5、20 mM 2ME) で 37℃ で 1 時間浸透することで溶解した。この溶解液を TALON metal affinity resin (Clontech 社製) に通し、10 mM イミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100 mM イミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物を PBS で一晚おきにバッファー交換しながら 3 日間透析し、タンパク質 hBSSP5-His および mBSSP5-His を得た。

実施例 4 BSSP5 遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質の pFBTrypSigTag/hBSSP5 を用いた発現

#### (1) pFBTrypSigTag/hBSSP5 の作製

配列番号 5 と 6 をアニールさせて NheI と BamHI 消化したフラグメント

をNhe I-BamH I消化したpSecTag2A (Invitrogen社製) に挿入し、pSecTrypHisとした。5  $\mu$ gのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamH Iを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングビーンヌクレアーゼ (宝酒造) を加えて室温 (25℃) で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXho Iでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase (宝酒造) を加えて65℃で30分反応した。

特開平9-149790またはBiochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、プラスミドpSPORT/ニューロシンを得た。pSPORT/ニューロシンより、配列番号7および8の配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のXho Iサイトを10 unitのXho Iで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これとpSecTrypHisをTAKARA ライゲーションキットを用いて挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンを得た (図3)。

配列番号9及び10の配列を有するプライマーを用いてpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNhe IとHind IIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。

プラスミドpSecTag2Aの1  $\mu$ g (0.1  $\mu$ l) を制限酵素Nhe IおよびBamH Iで処理することにより、IgGkのリーダー配列をコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、配列番号31および32の配列を有するDNAをそれぞれ100 pmoleずつ加え、70℃で10分間熱処理した後室温で30分間放置してアニーリングした。Nhe IとBamH Iで処理したHis分泌シグナル配列とpSecTag2A 1  $\mu$ lずつにDNALイゲーションキットVer. 2 (宝酒造株式会社) のI液を2.0  $\mu$ l加え、16℃で、30分間反応させた。

反応液に大腸菌コンピテントセルX L 1 - B l u e (STRATAGENE社) 0. 1 m lを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡績株式会社)を0. 9 m l加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5, 000 r p mで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、100  $\mu$  g / m lのアンプシリンを含むアンプシリンLBプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち、H i s 分泌シグナルのDNAが挿入されているものをPCRで選択し、それをp T r y p H i s とした。

10 p T r y p H i s のH i s T a g 領域を含むおよそ200 b pを配列番号10及び11の配列を有するプライマーによって増幅し、H i n d I I I とB a m H I による消化で生じたH i s T a g とエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40 b pの断片をp T r y p S i g に挿入してp T r y p S i g T a g を作製した(図4A)。

15 p T r y p S i g T a g のトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号8と12の配列を有するプライマーを用いたPCRによって作製したcDNAをB g l I I とB a m H I 消化によって切り出し、p F a s t B A C 1 (GIBCO)のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号8と13の配列を有するプライマーを用いたPCRによって確認し、ポリヘドリンプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、p F B T r y p S i g T a g とした。

20 5  $\mu$  g のp F B T r y p S i g T a g ベクターに対して20単位のB a m H I を加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位の細菌アルカリホスファターゼ(宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

E. c o l i p T r c H i s / h B S S P 5 (受託番号FERM P - 17038) から得られるp T r c H i s / h B S S P 5 またはp C R I I / h B S S P 5 より定法に従いPCRを行い、h B S S P 5 の活性体領域のcDNAを得

た。得られた cDNA を pFBTrypSigTag に挿入し pFBTrypSigTag/hBSSP5 を得た (図 4B)。この際、塩基配列を決定することにより、正しく hBSSP5 が挿入されているかを確認した。

pFBTrypSigTag/hBSSP5 を Gibco BRL BAC-TO-BAC baculovirus expression system のプロトコールに従ってバクミド DNA 上に Trypsinogen signal peptide、His tag、及びエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラ hBSSP5 を持つ組み換えバクミドを作製した。これを BAC-TO-BAC baculovirus expression system のマニュアルに従い Sf-9 細胞で発現させたところ、ウィルス感染後 2 日目より培養上清中に分泌された。

E. coli pTrcHis/mBSSP5 (受託番号 FERM P-17035) から得られる pTrcHis/mBSSP5 または実施例 1 で得られた pCRII/mBSSP5 を用いて、上記と同様に pFBTrypSigTag/mBSSP5 を作製し、分泌させることができる。

## (2) 酵素活性の測定

この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質 hBSSP5 をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清を PBS バッファーを用いてキレートカラム (Ni-NTA-Agarose, Qiagen 社製) に供し、PBS にイミダゾール (和光純薬工業) を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらに PD-10 カラム (Pharmacia 社製) で PBS バッファーに交換した。このサンプル 50  $\mu$ L にエンテロキナーゼ (1 U/1  $\mu$ L, Invitrogen 社製) 10  $\mu$ L を混和し、室温で 60 分反応させた。次に各種合成基質 (ペプチド研究所; Boc-Gln-Ala-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Bz-Arg-MCA、Boc-Val-Leu-Lys-MCA、Pyr-Gly-Arg-MCA、Pro-Phe-Arg-MCA、Boc-Val-Pro-Arg-MCA、Z-Arg-Arg-MCA、Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCA) を DMSO に溶解し、1 M Tris-HCl, (pH 8.0) で希釈した 0.2 M 基質溶液を 50  $\mu$ L 加え、さらに、37°C で反応した。1 時間後に励起波長 380 nm、蛍光波長 460 nm における、酵素作用に生じ

るAMC（7-アミノ-4-メチルクマリン）の蛍光を測定することにより、活性を測定した。

その結果、組換え融合タンパク質hBSSP5は、セリンプロテアーゼ活性を示すことが示された。また、マウス由来のmBSSP5についても同様に活性を有することが示された。

#### 実施例5 尿中のBSSP5の検出

ヒトおよびラットより採尿し、このうち10 $\mu$ Lを常法にしたがい12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、PVDF膜（Immobilon P、ミリポア社）上にブロットした。フィルターをスキムミルクでブロッキングした後、Tween-PBSで1000倍、10000倍に希釈した抗BSSP5抗体を室温で数時間から一晩反応させた。Tween-PBSで3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgGを反応させ、同様にTween-PBSで洗浄した。フィルターをBCIP/NBT溶液に浸し発色させたところ、ヒトおよびラット尿中に予想される分子量のBSSP5のバンドを検出した（図5）。

なお、用いた抗BSSP5抗体はhBSSP5に対するペプチド抗体であり、該抗体の作製は以下のようにして行った。

すなわち、配列番号2のアミノ酸番号56から73（Glu Tyr Asp Arg Ser Ser Asn Ala Glu Pro Leu Gln Val Leu Ser Val Ser Arg）およびアミノ酸番号207～225（Asn Val Arg Ala Pro Ala Val Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser Thr Trp Ile Asn）からなるペプチドのC末端側にシステインを1個付加させたペプチドを合成した。次にヘモシアニン（KLH）および架橋剤であるm-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロサクシニマイドエステル（m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester：MBS）を反応させ、KLH-MB複合体を作製した。それぞれの合成ペプチドとKLH-MBを反応させ、2種の免疫源を得た。得られた免疫源をウサギに、第1回目はフロイント完全アジュバントと共に投与し、その後2週間毎に合計3回フロイント不完全アジュバントと共に追加免疫した。最後の追加免疫の4日後に採血を行い血清を得、プロテインAカラムにより精製することによりhBSSP5に対するペプチド抗体を得た。

それぞれのペプチド抗体はB S S P 5に対し反応性を有することを確認した。実施例5および下記の実施例6で使用した抗B S S P 5抗体は、2種のペプチド抗体の混合物である。

#### 実施例6 ラット膵炎モデルにおける血中B S S P 5の変動

- 5 常法にしたがって4～6週齢ラットにセルレイン膵炎を誘導した。膵炎誘導前、誘導後6、12、24時間後に採血し血清を回収した。Blue Seph  
a r o s e (アマシャム・ファルマシア社)と混合することにより、血清アルブ  
ミンを除去してから、実施例1と同様に血清10 $\mu$ LをSDS-PAGE、ウェ  
スタンブロットし、抗B S S P 5抗体で検出した。その結果、健常時にも血中に  
10 B S S P 5は存在するが、膵炎誘導後12時間で一過的に血中B S S P 5が上昇  
し、血中B S S P 5を測定することで膵炎を検知できる可能性が示された(図  
6)。

#### 産業上の利用の可能性

- 15 本発明によって、単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ(h B S  
S P 5およびm B S S P 5)ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆  
体および多形性変種が提供される。さらに、本発明によって、h B S S P 5およ  
びm B S S P 5タンパク質ならびにh B S S P 5およびm B S S P 5ポリヌクレ  
オチドおよびタンパク質を含有する組成物、それらの製造方法および使用が提供  
20 される。

## 配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 5: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

5 SEQ ID NO: 6: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

SEQ ID NO: 7: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

SEQ ID NO: 8: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

10 SEQ ID NO: 9: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO: 10: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

15 SEQ ID NO: 11: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypHis

SEQ ID NO: 12: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypSigTag

SEQ ID NO: 13: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pFBTrypSigTag

20 SEQ ID NO: 14: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

SEQ ID NO: 15: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

25 SEQ ID NO: 16: Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (forward)

SEQ ID NO: 17: Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (forward)

SEQ ID NO: 18: Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (reverse)

SEQ ID NO: 19: Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (reverse)

SEQ ID NO: 20: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5F1 to amplify full length hBSSP5 (forward)

5 SEQ ID NO: 21: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5F2 to amplify mature hBSSP5-encoding region (forward)

SEQ ID NO: 22: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5R1/E to amplify full length hBSSP5 (reverse)

10 SEQ ID NO: 23: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5R4 for RT-PCR (reverse)

SEQ ID NO: 24: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5F1 for RACE for mBSSP5 (forward)

SEQ ID NO: 25: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5F2 for RACE for mBSSP5 (Forward)

15 SEQ ID NO: 26: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5F3 to amplify full length mBSSP5 (forward)

SEQ ID NO: 27: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5Fmature to amplify mature mBSSP5-encoding region (forward)

20 SEQ ID NO: 28: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5.1 for RACE for mBSSP5 (reverse)

SEQ ID NO: 29: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5R2 for RACE for mBSSP5 (reverse)

SEQ ID NO: 30: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5R3/E to amplify full length mBSSP5 (reverse)

25 SEQ ID NO: 31: Designed oligonucleotide to construct plasmid pT  
rypHis

SEQ ID NO: 32: Designed oligonucleotide to construct plasmid pT  
rypHis

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号2のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸231個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号1～231  
5 に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
2. 配列番号1の塩基番号110～802に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これら  
10 に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
3. 配列番号4のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸231個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号1～231  
15 に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
4. 配列番号3の塩基番号132～824に示す塩基配列、配列番号4に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とスト  
20 リンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
5. 配列番号4のアミノ酸番号-33～-1に示すアミノ酸33個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号-33～-1  
25 に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号-33～-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、ある

いはこれらの修飾体または断片。

6. 配列番号3の塩基番号33～131に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号-33～-1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号-33～-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはその断片。

7. 配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸264個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

8. 配列番号3の塩基番号33～824に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはこれらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号-33～231に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

9. 配列番号1に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号1に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10. 配列番号3に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号3に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

11. 請求項2、4、6、8～10のいずれか1つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

12. 請求項2、4、6、8～10のいずれか1つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

13. 請求項2または9のいずれか1つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP5を採取することを特徴とするタンパク質の製

造法。

14. 請求項4、6、8または10のいずれか1つ記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたmBSSP5を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

5 15. 細胞が、大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項13または14記載の製造法。

16. BSSP5遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

10 17. BSSP5遺伝子がBSSP5をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項16記載のトランスジェニック非ヒト動物。

18. 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項16記載のトランスジェニック非ヒト動物。

19. mBSSP5遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

15 20. 請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

21. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項20記載の抗体。

20 22. ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

25 23. 請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体と該タンパク質またはその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質またはその断片を測定する方法。

24. 請求項1記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とにより、検体中のhBSSP5もしくはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中のhBS

S P 5 もしくはその断片を測定する方法。

25. 請求項1記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化h B S S P 5と検体中のh B S S P 5もしくはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化h B S S P 5の量から検体中のh B S S P 5もしくはその断片の量を検出する、検体中のh B S S P 5もしくはその断片を測定する方法。

26. 検体が体液である、請求項23～25のいずれか1つに記載の方法。

27. 請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質を含む、組織における、疾患の診断マーカー。

28. 脳における、アルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項27記載のマーカー。

29. 脳、前立腺、胎盤、精巣、脾臓または膵臓における、癌、炎症の診断に用いる請求項27記載のマーカー。

30. 精液または精子における、不妊症の診断に用いる請求項27記載のマーカー。

31. 前立腺における、前立腺肥大症の診断に用いる請求項27記載のマーカー。

32. 血中または尿中における請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質濃度を測定することを含む膵炎の検出方法。

33. 請求項20または21に記載の抗体を含む膵炎検出剤。

34. 膵炎検出において用いる抗体の製造における請求項1、3、5または7のいずれか1つに記載のタンパク質またはそれらの修飾体の使用。

1/6

図 1

hBSSP-5

脾臓 腎 骨格筋 肝臓 肺 胎盤 脳 心臓

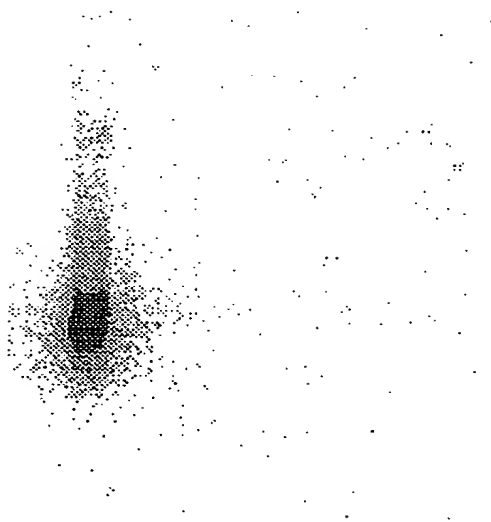




図 2

# mBSSP-5

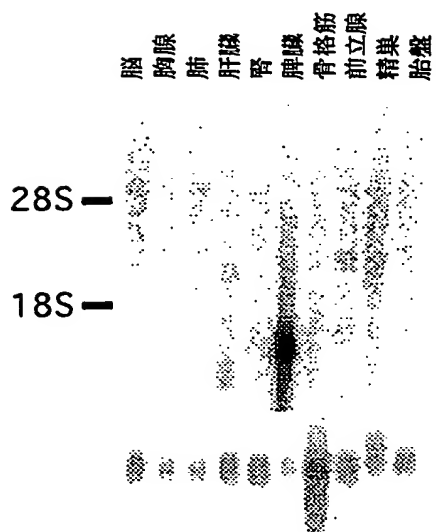
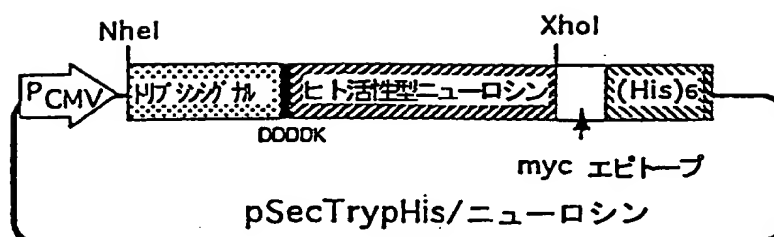




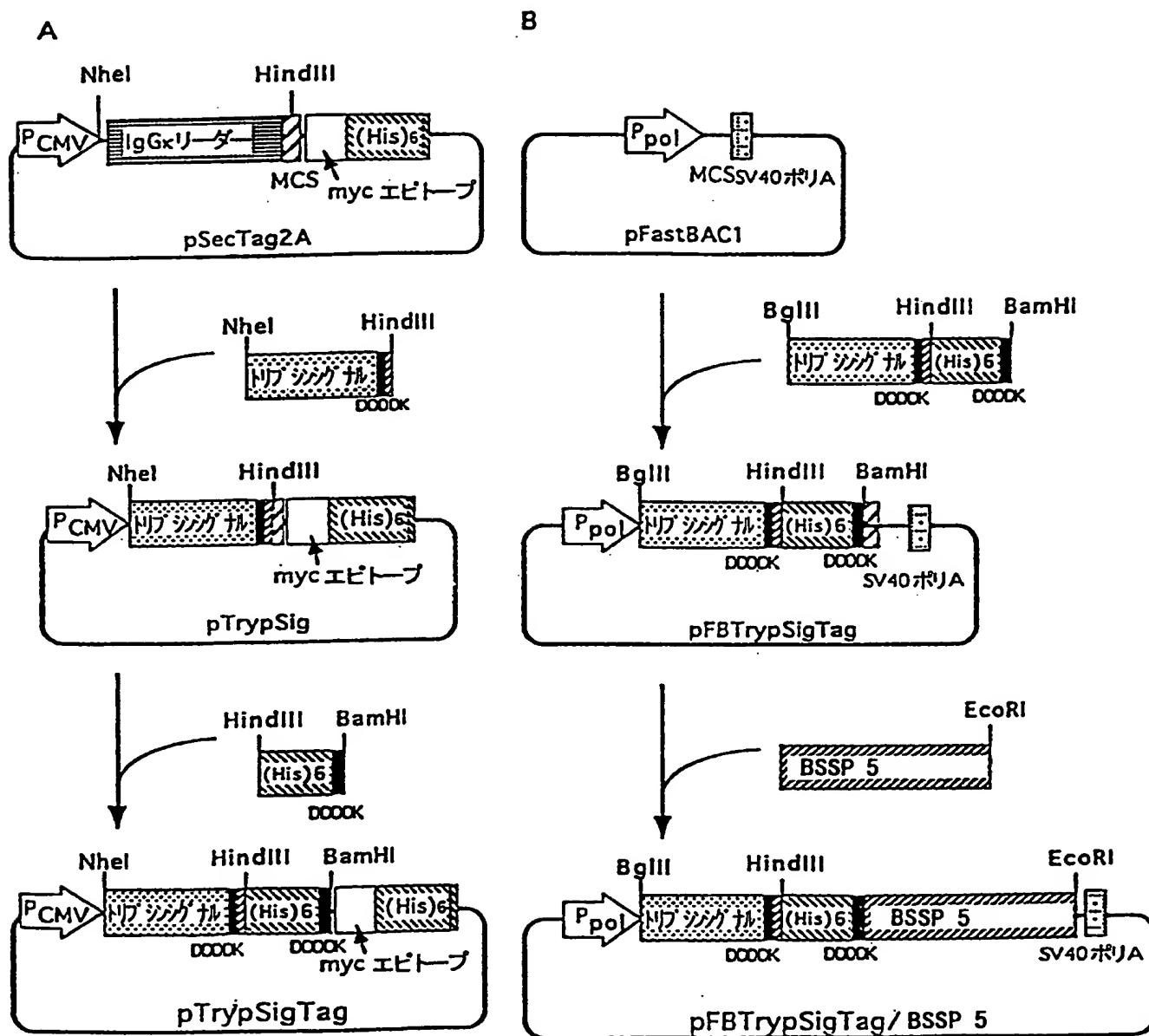
図 3





4 / 6

図 4

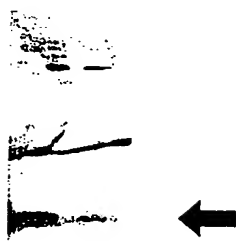




5/6

図 5

ヒトラット





6/6

図 6

0 6 18 24 時間





## SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.  
 <120> Novel serine protease BSSP5  
 5 <130> 661640  
 <150> JP 10-347806  
 <151> 1998-11-20  
 <160> 32

10 <210> 1  
 <211> 1149  
 <212> DNA  
 <213> human

15 <400> 1

		atctgccacg	10
	atg ttg ctg ctc agc ctg acc cta agc ctg gtt ctc ctc ggc tcc tcc		58
	Met Leu Leu Leu Ser Leu Thr Leu Ser Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser		
	-30 -25 -20		
20	tgg ggc tgc ggc att cct gcc atc aaa ccg gca ctg agc ttc agc cag agg		109
	Trp Gly Cys Gly Ile Pro Ala Ile Lys Pro Ala Leu Ser Phe Ser Gln Arg		
	-15 -10 -5 -1		
	att gtc aac ggg gag aat gca gtg ttg ggc tcc tgg ccc tgg cag gtg tcc		160
	Ile Val Asn Gly Glu Asn Ala Val Leu Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser		
25	1 5 10 15		
	ctg cag gac agc agc ggc ttc cac ttc tgc ggt ggt tct ctc atc agc cag		211
	Leu Gln Asp Ser Ser Gly Phe His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Gln		
	20 25 30		
	tcc tgg gtg gtc act gct gcc cac tgc aat gtc agc cct ggc cgc cat ttt		262



Ser Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Asn Val Ser Pro Gly Arg His Phe  
 35 40 45 50  
 gtt gtc ctg ggc gag tat gac cga tca tca aac gca gag ccc ttg cag gtt 313  
 Val Val Leu Gly Glu Tyr Asp Arg Ser Ser Asn Ala Glu Pro Leu Gln Val  
 5 55 60 65  
 ctg tcc gtc tct cgg gcc att aca cac cct agc tgg aac tct acc acc atg 364  
 Leu Ser Val Ser Arg Ala Ile Thr His Pro Ser Trp Asn Ser Thr Thr Met  
 70 75 80 85  
 aac aat gac gtg acg ctg ctg aag ctc gcc tcg cca gcc cag tac aca aca 415  
 10 Asn Asn Asp Val Thr Leu Leu Lys Leu Ala Ser Pro Ala Gln Tyr Thr Thr  
 90 95 100  
 cgc atc tcg cca gtt tgc ctg gca tcc tca aac gag gct ctg act gaa ggc 466  
 Arg Ile Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser Ser Asn Glu Ala Leu Thr Glu Gly  
 105 110 115  
 15 ctc acg tgt gtc acc acc ggc tgg ggt cgc ctc agt ggc gtg ggc aat gtg 517  
 Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Gly Val Gly Asn Val  
 120 125 130 135  
 aca cca gca cat ctg cag cag gtg gct ttg ccc ctg gtc act gtg aat cag 568  
 Thr Pro Ala His Leu Gln Gln Val Ala Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln  
 20 140 145 150  
 tgc cgg cag tac tgg gac tca agt atc act gac tcc atg atc tgt gca ggt 619  
 Cys Arg Gln Tyr Trp Asp Ser Ser Ile Thr Asp Ser Met Ile Cys Ala Gly  
 155 160 165 170  
 ggc gca ggt gcc tcc tcg tgc cag ggt gac tcc gga ggc cct ctt gtc tgc 670  
 25 Gly Ala Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys  
 175 180 185  
 cag aag gga aac aca tgg gtg ctt att ggt att gtc tcc tgg ggc acc aaa 721  
 Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys  
 190 195 200



3/18

aac tgc aat gtg cgc gca cct gct gtg tat act cga gtt agc aag ttc agc 772  
 Asn Cys Asn Val Arg Ala Pro Ala Val Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser  
 205 210 215 220  
 acc tgg atc aac cag gtc ata gcc tac aac tga gctcaccaca ggccctcccc 825  
 5 Thr Trp Ile Asn Gln Val Ile Ala Tyr Asn  
 225 230  
 agctcaaccc atttaaagga cccaggccct gtcccatcat gcattcatgt ctgtcttcct 885  
 ggctcaggag aaagaagagg ctgttgaggg tccgactccc tacttggact tctggcacag 945  
 aaggggctga gtgactcctt gagtagcagt ggctcttcct agagtagcca tgccgtggcc 1005  
 10 ggggccccca cccctcctcc agggcaaccc cttggctcta cagcaagaag ccagaactgt 1065  
 tggaatgaat ggcagccctc cttggagagg cagcctgttt actgaatata gaggatacgt 1125  
 ttacaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1149  
  
 <210> 2  
 15 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> human  
  
 <400> 2  
 20 Met Leu Leu Leu Ser Leu Thr Leu Ser Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser  
 -30 -25 -20  
 Trp Gly Cys Gly Ile Pro Ala Ile Lys Pro Ala Leu Ser Phe Ser Gln Arg  
 -15 -10 -5 -1  
 Ile Val Asn Gly Glu Asn Ala Val Leu Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser  
 25 1 5 10 15  
 Leu Gln Asp Ser Ser Gly Phe His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Gln  
 20 25 30  
 Ser Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Asn Val Ser Pro Gly Arg His Phe  
 35 40 45 50



4/18

Val Val Leu Gly Glu Tyr Asp Arg Ser Ser Asn Ala Glu Pro Leu Gln Val  
55 60 65  
Leu Ser Val Ser Arg Ala Ile Thr His Pro Ser Trp Asn Ser Thr Thr Met  
70 75 80 85  
5 Asn Asn Asp Val Thr Leu Leu Lys Leu Ala Ser Pro Ala Gln Tyr Thr Thr  
90 95 100  
Arg Ile Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser Ser Asn Glu Ala Leu Thr Glu Gly  
105 110 115  
Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Gly Val Gly Asn Val  
10 120 125 130 135  
Thr Pro Ala His Leu Gln Gln Val Ala Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln  
140 145 150  
Cys Arg Gln Tyr Trp Asp Ser Ser Ile Thr Asp Ser Met Ile Cys Ala Gly  
155 160 165 170  
15 Gly Ala Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys  
175 180 185  
Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys  
190 195 200  
Asn Cys Asn Val Arg Ala Pro Ala Val Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser  
20 205 210 215 220  
Thr Trp Ile Asn Gln Val Ile Ala Tyr Asn  
225 230

25 <210> 3  
<211> 834  
<212> DNA  
<213> mouse

&lt;400&gt; 3



5/18

gaccatctca acaccattcc ttatttgtca ca atg cta ctg ctc agc cta acc ctt 56  
 Met Leu Leu Leu Ser Leu Thr Leu  
 -30

agc ctg gtc ctc ctt ggc tcc tcc tgg ggc tgt ggt gtt cct gcc atc acg 107  
 5 Ser Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Cys Gly Val Pro Ala Ile Thr  
 -25 -20 -15 -10

cct gca ctg agc tac aat cag aga att gtc aac ggg gag aat gca gtg cca 158  
 Pro Ala Leu Ser Tyr Asn Gln Arg Ile Val Asn Gly Glu Asn Ala Val Pro  
 -5 -1 1 5

10 ggc tcc tgg ccc tgg cag gtg tct ctc cag gat aac ace ggc ttc cac ttc 209  
 Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Asp Asn Thr Gly Phe His Phe  
 10 15 20 25

tgc ggt ggt tct ctc atc agt ccg aac tgg gtg gtc acg gct gcc cac tgc 260  
 Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys  
 15 30 35 40

caa gtc acg cct gga cgc cac ttt gtc gtt ttg gga gaa tat gac cga tct 311  
 Gln Val Thr Pro Gly Arg His Phe Val Val Leu Gly Glu Tyr Asp Arg Ser  
 45 50 55 60

tcc aat gct gaa cct gtg cag gtc ctc tcg atc gca agg gcc atc aca cac 362  
 20 Ser Asn Ala Glu Pro Val Gln Val Leu Ser Ile Ala Arg Ala Ile Thr His  
 65 70 75

cct aac tgg aac gcc aac acc atg aac aat gac ctg act ctc ctg aag ctt 413  
 Pro Asn Trp Asn Ala Asn Thr Met Asn Asn Asp Leu Thr Leu Leu Lys Leu  
 80 85 90

15 gcc tcg cca gcc cgg tac aca gca caa gtc tca cca gtc tgc ctg gct tcc 464  
 Ala Ser Pro Ala Arg Tyr Thr Ala Gln Val Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser  
 95 100 105 110

aca aac gag gca ctg cct tcg ggg ctc acc tgt gtc acc act ggc tgg ggc 515  
 Thr Asn Glu Ala Leu Pro Ser Gly Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly



6/18

	115	120	125	
	cga atc agt ggt gtg ggc aat gtg aca cca gct cgc ctg cag caa gtt gtt			566
	Arg Ile Ser Gly Val Gly Asn Val Thr Pro Ala Arg Leu Gln Gln Val Val			
	130	135	140	145
5	cta ccc ctg gtc act gtg aat cag tgt cgg cag tac tgg ggt gca cgc att			617
	Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln Cys Arg Gln Tyr Trp Gly Ala Arg Ile			
	150	155	160	
	acc gat gcc atg ata tgt gca ggt ggc tca ggc gcc tcc tca tgt cag ggt			668
	Thr Asp Ala Met Ile Cys Ala Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly			
10	165	170	175	
	gac tca gga ggc cct ctt gtc tgc cag aag gga aac acc tgg gtg ctt att			719
	Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile			
	180	185	190	195
	ggg att gtc tcc tgg ggc act aag aac tgc aac ata caa gca ccg gcc atg			770
15	Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys Asn Cys Asn Ile Gln Ala Pro Ala Met			
	200	205	210	
	tac act cgg gtc agc aag ttc agt acc tgg atc aac caa gtc atg gcc tac			821
	Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser Thr Trp Ile Asn Gln Val Met Ala Tyr			
	215	220	225	230
20	aac taaactgtcc			834

Asn

<210> 4  
<211> 264  
<212> PRT  
<213> mouse

&lt;400&gt; 4



7/18

Met Leu Leu Leu Ser Leu Thr Leu

-30

Ser Leu Val Leu Leu Gly Ser Ser Trp Gly Cys Gly Val Pro Ala Ile Thr

-25

-20

-15

-10

5 Pro Ala Leu Ser Tyr Asn Gln Arg Ile Val Asn Gly Glu Asn Ala Val Pro

-5

-1 1

5

Gly Ser Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Asp Asn Thr Gly Phe His Phe

10

15

20

25

Cys Gly Gly Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys

10

30

35

40

Gln Val Thr Pro Gly Arg His Phe Val Val Leu Gly Glu Tyr Asp Arg Ser

45

50

55

60

Ser Asn Ala Glu Pro Val Gln Val Leu Ser Ile Ala Arg Ala Ile Thr His

65

70

75

15 Pro Asn Trp Asn Ala Asn Thr Met Asn Asn Asp Leu Thr Leu Leu Lys Leu

80

85

90

Ala Ser Pro Ala Arg Tyr Thr Ala Gln Val Ser Pro Val Cys Leu Ala Ser

95

100

105

110

Thr Asn Glu Ala Leu Pro Ser Gly Leu Thr Cys Val Thr Thr Gly Trp Gly

20

115

120

125

Arg Ile Ser Gly Val Gly Asn Val Thr Pro Ala Arg Leu Gln Gln Val Val

130

135

140

145

Leu Pro Leu Val Thr Val Asn Gln Cys Arg Gln Tyr Trp Gly Ala Arg Ile

150

155

160

25 Thr Asp Ala Met Ile Cys Ala Gly Gly Ser Gly Ala Ser Ser Cys Gln Gly

165

170

175

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Gln Lys Gly Asn Thr Trp Val Leu Ile

180

185

190

195

Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Lys Asn Cys Asn Ile Gln Ala Pro Ala Met



8/18

	200	205	210
	Tyr Thr Arg Val Ser Lys Phe Ser Thr Trp Ile Asn Gln Val Met Ala Tyr		
	215	220	225 230
	Asn		
5	<210> 5		
	<211> 99		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
10	<220>		
	<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis		
	<400> 5		
15	aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatacctt acctttgttg ctgctgctgt	60	
	tgctgcccc tttgacgacg atgacaagga tccgaattc	99	
	<210> 6		
	<211> 99		
	<212> DNA		
20	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis		
	<400> 6		
25	gaattcggat ccttgtcatc gtcgtcaaag ggggcagcaa cagcagcagc aacaaaggta	60	
	aggatcagga gtagattcat ggtgttgcta gccaaagctt	99	
	<210> 7		
	<211> 15		
30	<212> DNA		



9/18

<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
sequence  
5  
<400> 7  
ttggtgcatg gcgga 15  
  
<210> 8  
10 <211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
15 sequence  
  
<400> 8  
tcctcgagac ttggcctgaa tggtttt 27  
  
20 <210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
25 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin  
  
<400> 9  
gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc 35



10/18

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

10 &lt;400&gt; 10

tgaagcttgc catggaccaa cttgtcatc

29

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 26

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypHis

20

&lt;400&gt; 11

ccaagcttca ccatcaccat caccat

26

&lt;210&gt; 12

25 &lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid



11/18

pTrypSigTag

&lt;400&gt; 12

gcacagtcga ggctgat

17

5

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

10

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pFBTrypSigTag

&lt;400&gt; 13

15

caaatgtggt atggctg

17

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

20

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of  
serin proteases-encoding sequence

&lt;220&gt;

25

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;220&gt; 9, 12

&lt;223&gt; n is a, c, g or t.

&lt;400&gt; 14



12/18

gtgctcacng cngcbcaytg

20

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 20

5 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of  
serin proteases-encoding sequence

10 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;220&gt; 12, 15

&lt;223&gt; n is a, c, g or t.

15 &lt;400&gt; 15

ccvctrwsdc cncnggcga

20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

20 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (forward)

25 &lt;400&gt; 16

tgtcagccct ggccgccatt

20

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 20



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (forward)

5

<400> 17

gcgagtatga ccgatcatca

20

<210> 18

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (reverse)

15

<400> 18

cgccacctgc acagatcatg

20

<210> 19

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for RACE for hBSSP5 (reverse)

25

<400> 19

gaatcagtgc cggcagtact

20

<210> 20



<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5F1 to amplify  
full length hBSSP5 (forward)

<400> 20

tgccacgatg ttgctgctca

20

10

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15 <220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5F2 to amplify  
mature hBSSP5-encoding region (forward)

<400> 21

20 attgtcaacg gggagaatgc

20

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

25 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5R1/E to  
amplify full length hBSSP5 (reverse)



<400> 22

ggaattcggg tctttaatgg gttgagc

27

<210> 23

5 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP5R4 for RT-PCR  
(reverse)

<400> 23

cctggcacga ggaggcac

18

15 <210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5F1 for RACE  
for mBSSP5 (forward)

<400> 24

accatgaaca atgacctgac

20

25

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5F2 for RACE  
for mBSSP5 (forward)

5

<400> 25

gaatcagtgt cggcagt

17

<210> 26

<211> 20

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5F3 to amplify  
full length mBSSP5 (forward)

15

<400> 26

gaccatctca acaccattcc

20

<210> 27

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5Fmature to  
amplify mature mBSSP5-encoding region (forward)

25

<400> 27

attgtcaacg gggagaatgc

20



<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5.1 for RACE  
for mBSSP5 (reverse)

<400> 28

10 atggcatcgg taatgcgtgc

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5R2 for RACE  
for mBSSP5 (reverse)

20 <400> 29

caggtgtttc ccttctggca

20

<210> 30

<211> 27

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP5R3/E to  
amplify full length mBSSP5 (reverse)



<400> 30

ggaattcgga cagtttagtt gtaggcc

27

5

<210> 31

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 31

aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatacctt acctttgttg ctgctgctgt 60

tgctgcccc tttcaccatc accatcacca tgacgacgat gacaaggatc cgaattc 117

15

<210> 32

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 32

gaattcggat ccttgatcatc gtcgtcatgg tgatggatgat ggtgaaaggg ggcagcaaca 60

25

gcagcagcaa caaaggtaag gatcaggagt agattcatgg tgttgctagc caagctt 117



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06473

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08,  
G01N33/53 // (C12N9/50, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08,  
G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Human Molecular Genetics Vol.2 No.10 (1993) Larsen F., et al., "A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1"p.1589-1595, especially p.1590, right column to p.1591, left column; Fig. 5	1-26 27-34
X Y	Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.239 (1997) Yamamura Y., et al., "Molecular cloning of a novel brain-specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs"p.386-392, especially, p.387, left column	1-26 27-34
A Y	WO, 97/24135, A1 (LU Tianbao et al.), 10 July, 1997 (10.07.97), especially, p.1-2 & AU, 9714323, A & NO, 9802987, A & CZ, 9802066, A3 & EP, 883405, A1 & NZ, 326076, A & AU, 706145, B & BR, 9612360, A & HU, 9902256, A2	1-26 27-34
A Y	US, 5731439, A (The DuPont Merck Pharmaceutical Company), 24 March, 1998 (24.03.98),	1-26 27-34

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
10 February, 2000 (10.02.00)

Date of mailing of the international search report  
22 February, 2000 (22.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06473

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	especially, Column 17 (Family: none)	

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53  
// (C12N9/50, C12R1:19) (C12N1/21, C12R1:19)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N9/50, C12N15/57, C12N1/21, A01K67/027, C07K16/40, C12P21/08, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Human Molecular Genetics Vol.2 No.10 (1993) Larsen F. et al. "A tight cluster of five unrelated human genes on chromosome 16q22.1" p.1589-1595 特にp.1590右欄～ p.1591左欄、図5	1-26 27-34
X Y	Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.239 (1997) Yamamura Y. et al. "Molecular cloning of a novel brain -specific serine protease with a kringle-like structure and three scavenger receptor cysteine-rich motifs" p.386-392 特に p.387左欄	1-26 27-34

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.02.00

国際調査報告の発送日

22.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子

4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{A}{Y}$	WO, 97/24135, A1 (LU Tianbao et al.) 10. 7月. 97 (10. 07. 97) 特に p. 1-2 & AU, 9714323, A & NO, 9802987, A & CZ, 9802066, A3 & EP, 883405, A1 & NZ, 326076, A & AU, 706145, B & BR, 9612360, A & HU, 9902256, A2	$\frac{1-26}{27-34}$
$\frac{A}{Y}$	US, 5731439, A (The DuPont Merck Pharmaceutical Company) 24. 3月. 98 (24. 03. 98) 特に 第17欄 (ファミリーなし)	$\frac{1-26}{27-34}$